

牛藍舌病血清抗體快速測定法

林 榮 培

台灣省家畜衛生試驗所

以酵素連結免疫吸附試驗 (ELISA) 測定 420 份牛血清標本中藍舌病特異抗體，並利用微電腦及設計之程式，將自 ELISA Reader 分光光度計測得輸入之 96 孔微量滴定盤各孔的光密度 (O.D.) 值，加以儲存、運算，然後由顯示幕顯示出來，並經由印表機印出微量滴定盤各孔的 O.D. 值，P/N 比，陽性百分比及分佈圖。經由分析大量已知陽性血清及陰性血清的 ELISA 分佈，確定陰性反應的上限值，可快速判定牛隻是否存有藍舌病之抗體。

牛藍舌病 ELISA 試驗與免疫擴散試驗比較之結果，發現 ELISA 是一種比較敏感的血清學檢查方法，加以微電腦之處理則比免疫擴散法快速甚多。整個試驗與報告可於三個小時內完成。

藍舌病 (Blue Tongue) 是反芻獸的病毒性傳染病，感染的動物會有充血、水腫和出血的特徵，羊感染本病會有典型的發熱、削瘦、口腔病變、跛行與大量死亡，經常造成小羊的嚴重損失。牛的症状常較溫和，死亡率也低。本病藉由昆蟲 (*Culicoides Variipennis*) 傳播，但感染母牛可經由子宮傳染給小牛，感染公牛精液中帶有病毒，可成爲帶原者。目前已知本病的血清型有 20 種以上，其中有 4 型在美國發生，因此在進口檢疫上，血清中本病抗體之檢出，是很重要之一項。

一般動物血清之中和抗體力價均使用組織培養百分之 50 感染價 (TCID₅₀) 法來測定⁽¹⁾，其準確性高且可定量爲其優點，但是本法手續繁複，必須具備細胞培養之技術、設備且須費時一星期左右才有結果，在進出口檢疫、防疫計畫及預防接種之施行須要快速明瞭抗體存在之情形時，有其不便之處。因而有了免疫擴散法之應用⁽²⁾，但該法敏感性不高爲其最大缺點，且也須一天以上之時間方有結果。因而，最近有酵素連結免疫吸附試驗 (ELISA) 之開發⁽³⁾，而且漸漸被廣泛地應用，並認爲是一種敏感而實用的方法。

但是如何對 ELISA 結果進行合理的分析，確定陰性反應的上限值，則是一個十分重要的問題。此項分析往往須花費甚長之時間，如果分析稍有不慎，則有誤導的可能，其結果將發生很大差異。目前微電腦甚爲普遍而價格也不貴，本試驗是將 ELISA 之數據，經由微電腦之處理，來快速測定牛血清中藍舌病之特異抗體，並與免疫擴散法做一比較。

材 料 與 方 法

抗原製備：

藍舌病病毒 (血清型 17) 接種 BHK - 23 單層細胞，于 37 °C 感作 2 小時，加入 MEM 維持液，置 33 °C 培養，當細胞呈現 98% CPE 時收取後⁽⁴⁾，經 8,000 g 60 分鐘離心，收取沈澱之細胞，以含 0.5% Triton X - 100 的 0.002M Tris 緩衝液 (PH 8.8) 重新懸浮沈澱的細胞，以超音波處理三次，每次 30 秒，然後以 10,000 g 離心 60 分鐘，收取上清液保存於 4 °C。重新懸浮細胞，再做二次同樣之處理。將三次處理所收集的上清液置於 40% 蔗糖液面上，以高速離心機 (Beckman) 24,000 轉離心 90 分鐘，將沈澱物以 0.002M Tris 緩衝液 (PH 8.8) 溶解，分裝保存於 - 80 °C 備用。

製備之純化抗原經以分光光度計測定其蛋白質含量，測定結果其蛋白質含量在 2mg ~ 5mg / ml。

血清：

陽性對照血清採自牛藍舌病感染的成年牛，血清經免疫擴散試驗判定為陽性。陰性對照血清採自牛藍舌病攻毒試驗的陰性對照成年牛，經免疫擴散試驗判定為陰性。血清少量分裝然後保存於 -20°C 。

試驗血清分別來自美國加州藍舌病流行的地區和加拿大魁北克省 (QUEBEC) 無藍舌病污染地區。

免疫擴散試驗：

操作方法依照美國農業部牛藍舌病免疫擴散操作規程⁽⁹⁾進行，並參考鍾等⁽²⁾之方法。

藍舌病間接 ELISA 試驗⁽⁵⁾⁽⁶⁾抗原用 PH 9.6 的 0.05 M 碳酸鈉緩衝液稀釋。稀釋後的抗原加入 96 孔免疫微量滴定盤 (Titertek[®])，每孔 0.05 ml，置 37°C 感作 3 小時後，放入 4°C 中感作一夜。經抗原被覆後的微量滴定盤各孔用含 0.05 % Tween-20 的生理鹽水洗液沖洗三次，甩乾後每孔加入 1 : 40 稀釋的血清 0.05 ml，每一血清標本設二孔，每塊微量滴定盤均設空白對照 (不加血清)、陽性及陰性血清對照。加蓋後置 37°C 搖擺感作 45 分鐘。取出微量滴定盤，以前述相同方法沖洗三次後甩乾。每孔再加入 1 : 1,000 稀釋的渠草根過氧化酵素山羊抗牛 IgG (H+L) 抗體 (KPL 公司出品)，置 37°C 搖擺感作 60 分鐘。血清及酵素結合山羊抗牛 IgG 均用含 0.1 % 結晶牛血清白蛋白 (BSA) 和 0.05 % Tween 20，PH 7.4 的 Tris 緩衝液稀釋。取出微量滴定盤，沖洗三次後甩乾。每孔加入 0.1 ml 新鮮配置的 ABTS [2,2'-AZINO-bis- (3 - Ethylbenz-Thiazoline) Sulfonic Acid] Substrate，在室溫搖擺感作 20 分鐘，待陽性對照孔出現深綠色時，再加入等量的 0.1 M 氫氟酸溶液 (PH 3.3) 終止反應。

試驗數據的讀取、運算與處理：

微量滴定盤每孔的 O.D 值由 Dynatech MR - 580 ELISA 分光光度計在 405 / 450 nm 波長 (試驗波長 / 參考波長) 處讀取。試驗波長及參考波長測出各孔的 O.D. 校正值經 RS - 232 - C 介面傳送到 TRS - 80 MOD II 電腦，通過 BASIC 程式進行一系列運算⁽⁶⁾⁽⁷⁾。

電腦根據指令經由印表機把微量滴定盤各孔的 O.D. 值印出，同時計算出陽性和陰性對照血清的算術平均及標準偏差 (S.D.)、P/N 比 ($\frac{\text{陽性對照血清 O.D.}}{\text{陰性對照血清 O.D.}}$)，並印出來 (圖一)。進一步的運算是電腦按照指令把雙份血清的陽性百分比 (ELISA %) ($\frac{\text{試驗血清 O.D.}}{\text{陽性對照血清 O.D.}} \times 100\%$) 印出 (圖二)，最後把 ELISA % 的分佈以分布圖 (Histogram) 印出 (圖三)。所有的資料都可以貯存於磁碟中，並可隨時提取。

結 果

抗原、血清稀釋：

通過棋盤式滴定，用陽性和陰性血清確定每批抗原的最佳稀釋，每 1 ml 的碳酸鈉緩衝液以含 0.1 μg 抗原 (蛋白質量) 為宜。

陽性和陰性血清作對倍稀釋，比較稀釋血清的 O.D. 值曲綫 (圖四) 和 P / N 比值，確定血清的稀釋以 1 : 40 為理想。

陽性血清上限值的判定：

來自加拿大東部非藍舌病疫區的牛血清 18 份以及陰性對照血清的 ELISA % 值均在 20 以下，而來自加州藍舌病感染群的血清 22 份以及陽性對照血清的 ELISA % 值則在 30 ~ 100 之間。據此，陰性反應的上限值應在 20，也即 ELISA % 值 > 20 為陽性， ≤ 20 為陰性。(圖三)。

ELISA 試驗與免疫擴散試驗的比較：

被檢血清共 420 份，二者均為陽性者有 164 份，其中 ELISA 試驗為陽性而免疫擴散為陰性的血清有 118 份。詳如表一。

表一 ELISA試驗與免疫擴散試驗結果比較

		ELISA 試驗	
		陽 性	陰 性
免 疫 擴 散	試 驗 陽 性	164	0
	試 驗 陰 性	118	138

EXPRESSED AS RAW DATA Fri May 31 1985
VERTICAL FORMAT DYNATECH PLATE

ROW	COLUMN											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.001	0.546	0.043	0.237	0.257	0.216	0.158	0.044	0.175	0.216	0.057	0.193
B	0.000	0.455	0.036	0.191	0.248	0.133	0.101	0.048	0.178	0.228	0.057	0.217
C	0.000	0.045	0.182	0.068	0.208	0.234	0.263	0.052	0.087	0.330	0.137	0.302
D	0.000	0.041	0.187	0.057	0.252	0.300	0.292	0.055	0.120	0.314	0.130	0.300
E	0.000	0.298	0.292	0.113	0.160	0.089	0.085	0.060	0.318	0.099	0.112	0.297
F	0.000	0.310	0.309	0.115	0.161	0.071	0.045	0.052	0.309	0.113	0.115	0.284
G	0.000	0.029	0.013	0.093	0.056	0.176	0.049	0.223	0.144	0.067	0.400	0.388
H	0.001	0.034	0.045	0.097	0.053	0.171	0.054	0.254	0.164	0.106	0.373	0.364

Blanks are in column 1

MEAN of POSITIVE controls= .5005 S.D. of Positives= .0643467

MEAN of NEGATIVE controls= .043 S.D. of Negatives= 2.82827E-03

P/N Ratio= %11.640

BASE VALUE= .5005

DISCRIMINATOR VALUE= 10.0453

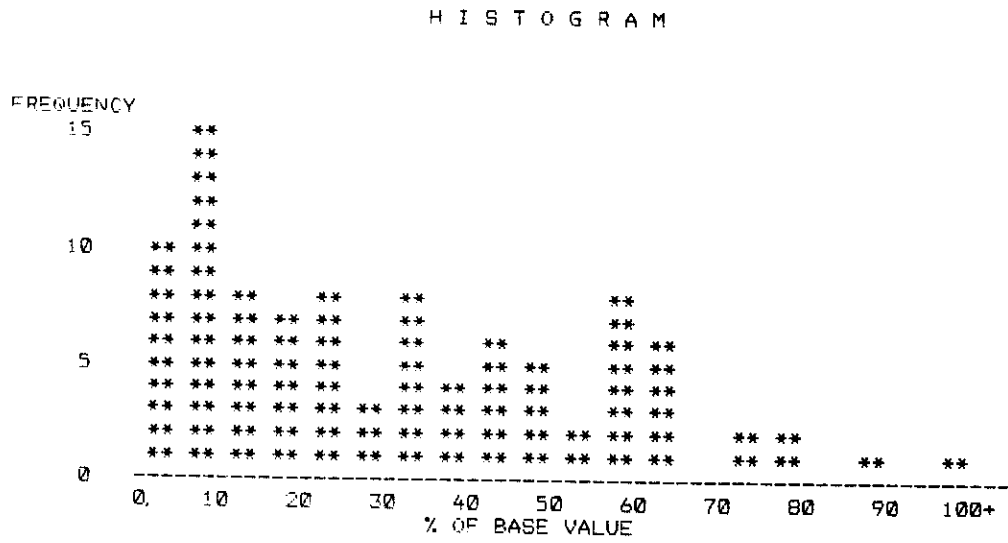
圖一 印表機印出之原始O.D值

EXPRESSED AS ELISA %
VERTICAL FORMAT DOUBLETS

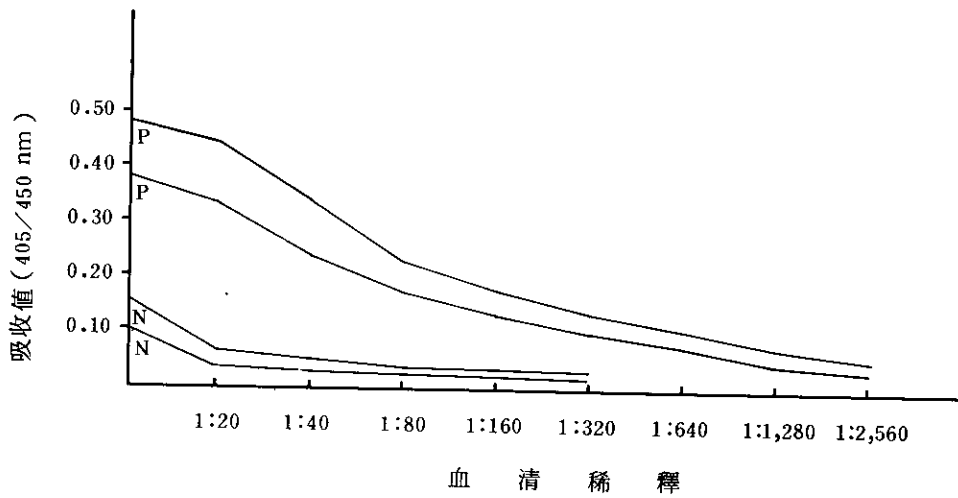
ROW	COLUMN											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	P 109	7	42	50	34	25	9	35	44	11	40
B	0	P 90	0	.03	0	.05*	.04	0	0	0	0	.01
C	0	N 8	36	12	45	53	55	10	20	64	26	60
D	0	N 8	0	0	.03	.04	.02	0	.02	.01	0	0
E	0	59	60	22	32	15	12	11	62	21	22	58
F	0	61	.01	0	0	.01	.02	0	0	0	0	0
G	0	5	5	18	10	34	10	47	30	17	77	75
H	0	6	.02	0	0	0	0	.02	.01	.02	.01	.01

TRANSFORMATION APPLIED: Percent of Positive **S.D. ABOVE SPECIFIED: .05

圖二 每兩孔O.D.的陽性百分比



圖三、根據陽性百分比印出之分佈圖 (Histogram)



圖四、血清稀釋與光吸收值曲綫圖

P = 陽性

N = 陰性

討 論

ELISA 試驗一個關鍵性的問題是如何判定試驗的結果。本 ELISA 試驗用於定性，在電腦的幫助下，能很快的把結果整理出來。在本試驗中 ELISA 與免疫擴散的結果符合率不太理想，但在有些報告⁽⁴⁾⁽⁷⁾中，ELISA 與改良補體結合反應的結果有很可觀的一致性。相當多免疫擴散試驗為陰性的血清在 ELISA 試驗中却是陽性，顯示了該試驗是一種敏感的方法。

從人工感染藍舌病牛抗體消長規律中顯示出，感染後 10 天可出現中和抗體和補體結合抗體⁽⁵⁾，3~4 週才能以免疫擴散法測出抗體。因此，ELISA 很可能作為一種診斷牛藍舌病早期感染的方法。

Bolton⁽³⁾發現以 ELISA 測定牛血清中 IBR 抗體，比中和斑點產生法，敏感 1000-fold。

試驗中採用了固定陽性對照血清，相對固定陰性血清，有利於每次試驗的標準化，陰性對照血清不僅是免疫擴散陰性，而且來自非疫區，每次試驗均設有 4 份以上的陰性對照血清，這樣就增加了試驗的準確性，減少了不必要的誤差。然而，試驗中實際上有不少陽性反應是十分接近陰性上限值的，這可能是邊緣效應（微量滴定盤的週邊孔常會出現非特异性反應）或技術上的原因。在這種情況下，有必要重複這些血清的檢驗，或微量滴定盤的週邊孔不用。

試驗中有 39 份病毒分離陽性牛的血清，其中應用 ELISA 方法檢出陽性的有 29 份（74%），應用免疫擴散試驗檢出陽性的有 24 份（62%），由此看來，ELISA 對診斷活動性藍舌病病毒感染的牛要比免疫擴散試驗敏感。

應用陽性百分比來表示牛血清中藍舌病病毒的 IgG 抗體看來是一種比較理想的方法，它適用於單一血清稀釋，易於理解和比較，重複性較好。本試驗用電腦處理所有數據，大大加快了分析的速率，從分光光度計讀判到全部資料印出，只需要五分鐘。

由於電腦的廣泛應用，使 ELISA 試驗向自動化方面邁進了一步⁽⁶⁾⁽⁷⁾。在進出口檢疫中，對縮短潛伏疫病的檢出時間，減少檢疫困擾，在流行病學的研究中，對處理分析大批數據，避免不必要的錯誤與誤差均有肯定的意義在。如應用於目前禽畜之中和抗體調查測定，例如假性狂犬病、TGE、豬瘟等，將可快速不少。

誌 謝

本試驗之完成承蒙美國戴維斯加州大學 Dr. D. E. Behymer, Dr. K. Lam 及 Dr. B. Chen 的指導和提供設備與材料，特此致謝。

參 考 文 獻

1. 林榮培等 (1976) 台灣地區豬傳染性胃腸炎抗體分佈調查。台灣省家畜衛生試驗所研究報告 13 : 45 ~ 51。
2. 鍾明華、賴秀穗 (1979) 微量免疫擴散與中和試驗對豬假性狂犬病血清抗體測定比較。中華民國獸醫學會雜誌 5 : 67-70。
3. David C. Bolton et al. (1981) Evaluation of the critical parameters of a sensitive ELISA test using purified infectious Bovine Rhinotracheitis virus antigens. *Veterinary Microbiology* 6 : 265-279。
4. Gumm I.D. et al. (1982) The preparation of purified Bluetongue virus group antigen for use as a diagnostic reagent. *Archives of Virology* 72 : 83-93。
5. Poll G. et al. (1982) Bluetongue Virus : Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay, immunodiffusion and serum neutraliza-

- tion for detection of viral antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*. Jan : 159 : 162 .
6. Michael J.C. and D. Shaffer (1984) A computer program for the evaluation of ELISA data obtained using an automated microtiter plate absorbance reader. *Journal of Immunological Methods*. 74 : 205-215 .
 7. Thomas R.S., Vanderlaan M. and Jensen R.H. (1983) A computer-based data analysis system for Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Journal of Immunological Methods*. 65 : 83-95 .
 8. Voller A. et al. (1979) The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Dynatech Laboratories Inc .
 9. Protocol for the immunodiffusion test for Bluetongue (1979) Committee on bluetongue of the American association of veterinary laboratory diagnosticians .

A Rapid Assay for the Detection of Bluetongue Viral Antibody

Yung-Pei Lin

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

Employing the methods of microimmunodiffusion (MIDT) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to assay for bluetongue virus (BTV) antibody from 420 samples of bovine sera, the results indicate that the ELISA is a rapid and sensitive diagnostic test for the detection of BTV antibody in bovine sera. At the same time, it also shows that the ELISA procedure is more quick and accurate than the MIDT, if the data obtained is analyzed by using a microcomputer system.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100